

Aus der I. Medizinischen- und Poliklinik der Johannes-
Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof.Dr.R.Duesberg

UNTERSUCHUNGEN
ZUR FIXATION VON ANTIGENEN
AN ERYTHROCYTEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Harald Stork
aus Mainz

Mainz
1964

Aus der I. Medizinischen- und Poliklinik der Johannes-
Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Prof.Dr.R.Duesberg

UNTERSUCHUNGEN
ZUR FIXATION VON ANTIGENEN
AN ERYTHROCYTEN

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Johannes-Gutenberg-Universität
Mainz



vorgelegt von
Harald Stork
aus Mainz

Mainz

7 1964

Dekan: Prof. Dr. Korting
Referent: Priv.Do. Dr. Mohring
Korreferent: Prof. Dr. Duesberg

M e i n e n E l t e r n g e w i d m e t

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methodik	5
III. Ergebnisse	11
IV. Diskussion	25
V. Zusammenfassung	39
VI. Literaturverzeichnis	40
VII. Lebenslauf	45

I Einleitung

Seit seiner Entdeckung durch A. Leuwenhoek im Jahre 1673 war der Erythrocyt lange Zeit Gegenstand einer vorwiegend morphologisch-deskriptiven Betrachtungsweise. Erst die in den letzten Jahrzehnten besonders stark in den Vordergrund getretene Ergänzung der hämatologischen Forschung durch moderne Methoden der Biochemie und Physiologie führte zu den uns heute bekannten Daten, nicht nur über Aufbau und Gestalt, sondern auch speziell über die funktionelle Leistungsfähigkeit des Erythrocyten.

Charakteristisch für das rote Blutkörperchen ist, daß es im Laufe seiner Reifung schließlich als kernlose Zelle im strömenden Blut erscheint, eine Eigenschaft, die nur bei pathologischen Zuständen aufgehoben ist. Die für den Organismus wichtigste und lebenserhaltende Funktion ist der Transport des Sauerstoffs, darüberhinaus beeinflussen die roten Blutzellen die Regulierung des Säure-Basenhaushaltes. Zur Aufrechterhaltung seiner korpuskulären Intaktheit besitzt der Erythrocyt zur Energiegewinnung neben einem nur rudimentär ausgeprägten oxydativen, einen weit stärker angelegten und im normalen Energiestoffwechsel überwiegenden glycolytischen Fermentapparat (69). Die experimentelle Bearbeitung der hiermit in Zusammenhang stehenden Fragen, insbesondere in Richtung auf Qualität und Leistungsfähigkeit der enzymatischen Ausstattung des Erythrocyten, führte recht bald zur Entdeckung zahlreicher, z. T. erblicher Fermentdefekte (44, 48, 88). Aber auch die Membran war Gegenstand ausgedehnter Forschungen, denn nur so konnte man Aufschlüsse über die Wirkung der Blutgruppensubstanzen wie auch über den eigentlichen Mechanismus der Zellzerstörung, der Lyse, er-

warten (40, 67, 88). Wie PRANKERT, einer der besten Kenner der Materie, ausführt, setzt sich die Membran im wesentlichen aus einem Lipid- und einem Proteinanteil zusammen, wobei der Lipidanteil vermutlich nur 10% ausmacht, der Rest auf Proteine einschließlich eines gewissen Anteils von fest gebundenem Hämoglobin. Ganz grob konnte die Proteinfraction bisher in ein Elinin genanntes Protein und das sogenannte S-Protein aufgetrennt werden. Das in der Membran gefundene Hämoglobin wurde mit der Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität in Zusammenhang gebracht. Wie die Analysen DANDLICKERS zeigen, besitzt Elinin eine ausgesprochen fibrilläre Struktur (21). Analytisch erwies es sich als ein Lipid-Protein-Kohlehydratkomplex, der A-, B- und Rh-Blutgruppensubstanzen enthält. Man weiss weiterhin, daß die erythrocytäre Membran eine vom umgebenden Milieu abhängige Oberflächenladung besitzt, die im wesentlichen durch freie Phosphatradikale und Carboxylgruppen der Neuraminsäure bedingt ist (2, 16, 68).

Eine andere Forschungsrichtung, die durch den Nachweis der Erregerbedingtheit der Infektionskrankheiten, vor allem durch die Arbeiten von PASTEUR und KOCH gelöst wurde, ließ die Frage nach der Möglichkeit einer im menschlichen Organismus gegebenen spezifischen oder unspezifischen Infektabwehr aktuell werden. Hier führten die Forschungsergebnisse zu theoretisch fassbaren Gesetzmäßigkeiten innerhalb der immunologischen Vorgänge (11, 41). Es wurde der Begriff des Antigens, das wie man erkannte-unterschiedlichster Herkunft sein konnte, eingeführt, wobei man Antigene als solche Substanzen definierte, die in höheren Organismen zur Bildung von Antikörpern führen. Die chemischen und chemisch-physikalischen Eigenschaften und Reaktionsmöglichkeiten der Antigene wurden untersucht (41, 79, 89).

Hier sei auf die grundlegenden Arbeiten von S. ARRHENIUS verwiesen, nach dessen Definition die Antigen-Antikörperreaktion in ihrem Ablauf den für chemische Reaktionen gültigen Gesetzen folgt, so daß der von ihm geprägte Terminus Immunchemie auch von dieser Seite her berechtigt ist (1). Die mit der schon früh erkannten immunologischen Spezifität zusammenhängenden Fragen wurden besonders von LANDSTEINER weitgehend geklärt (45, 89). Er fand, daß bestimmte, als determinante Gruppen bezeichnete, niedermolekulare Areale bzw. Bezirke, der hochmolekularen Antigene für die Spezifität verantwortlich sind, ein Befund der zur Grundlage zahlreicher Ergebnisse der praktischen Immunologie wurde (19, 37, 52a u.a.).

Diese Erkenntnisse waren für die hier abgehandelte Thematik insofern von Bedeutung, als man bei den Forschungen über Aethilogie und Pathogenese von hämolytischen Prozessen auch auf solche stieß, die in das Gebiet der Immunologie hineinreichten. Es zeigte sich nämlich, daß der Erythrocyt unter bestimmten Bedingungen selbst als antigenes Gebilde wirken kann, wodurch er den Organismus zur Bildung spezifischer, gegen die roten Blutzellen gerichteter Antikörper anregt. Als eine der Ursachen einer derartigen intravital auftretenden Umwandlung zum Antigen kann aber auch - wie Arbeiten der letzten Jahre ergaben - allein die Fixierung von Fremdmaterial, z. B. Bakterien, Viren, Toxine, gelten, wenn auch in einem solchen Fall nicht immer eindeutig ist, ob die Antikörper sich primär nur gegen das außen angelagerte Antigen oder gegen das durch das Antigen alterierte und damit selbst 'körperfremd' gewordene Membranmaterial als solches richten. Der resultierende Effekt - ein vorzeitiger Zelluntergang - ist allerdings in beiden Fällen der gleiche. Als Beispiel hierzu sei angeführt, daß man mittels radioaktiver Markierungstech-

nik hat nachweisen können, daß z. B. mit Viren beladene Erythrocyten einem beschleunigten Abbau unterliegen (30), wozu bekannt ist, daß am Erythrocyten für Viren, z. B. Influenza, definierte Haftareale gegeben sind (36). BOYDEN und LÜDERITZ konnten ein Haften von bakteriellen Antigenen an der Erythrocytenmembran nachweisen (12,50,51). Da auf Grund dieser und ähnlicher Untersuchungsergebnisse das Auftreten dieserart immunologisch bedingter, hämolytischer Anaemien anzunehmen war, ergab sich die weitere Frage, ob nicht dem Erythrocyten über die eingangs geschilderten, allgemein geläufigen biologischen Funktionen eine Rolle im Rahmen des körpereigenen Abwehrgeschehens zukommt, etwa in dem von DUESBERG erstmals diskutierten Sinn, daß durch die Bindung von Antigen und Antikörper mit nachfolgender Eliminierung eine echte 'Neutralisierung', d. h. Unschädlichmachung, durch den Erythrocyten erfolgt (25, 26).

Das Anliegen dieser Arbeit war nun, zu prüfen in welchem Umfang und unter welchen Bedingungen Modellantigene von Protein- und Lipopolysaccharidcharakter in der Lage sind an der Erythrocytenmembran zu haften. Als Protein-Antigen wurde mehrfach kristallisierte Hefe-Alkoholdehydrogenase (ADH) und als Lipopolysaccharid-Antigen Endotoxin aus *S.abortus equi* verwendet. Die Antigene wurden radioaktiv markiert, im ersteren Fall mit S^{35} , im zweiten Fall mit Cr^{51} . Besonderen Wert maßen wir bei unseren Untersuchungen der Frage bei, inwieweit die Beladung pH-abhängig ist und welchen Einfluß Nebennierenrinden-Steroide auf die Beladung nehmen; besonders im Zusammenhang mit letzterer Fragestellung führten wir auch Versuche zur Beladung menschlicher O-Rh-Erythrocyten mit Anti-D-Serum durch. Zur Frage der experimentellen Hämolysen prüften wir, ob mit Modellantigenen beladene Erythrocyten eine gegenüber Kontrollenerhöhte Hämolyserate im Komplementhaltigen bzw. komplementfreien Serum aufwiesen.

II Material und Methodik

Die Versuche wurden als in-vitro-Versuche an Kaninchen-Erythrocyten durchgeführt. Für die Untersuchungen mit D-spezifischem Anti-D-Serum wurden menschliche Erythrocyten der Blutgruppe O, Rh, verwendet.

1.) Gewinnung der Zellen

Die zu unseren Versuchen eingesetzten Kaninchen- und Human-Erythrocyten wurden aus Vollblut gewonnen; die Kaninchen-Erythrocyten wurden durch Punktion aus der Ohrvene, die Humanerythrocyten durch Punktion der Kubitalvene erhalten. Als gerinnungshemmende Substanz wurden zu je 10 ml Vollblut 5 Tropfen Vetren (Firma Promonta, Hamburg) zugesetzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und bei Zimmertemperatur dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung im Volumenverhältnis 1 : 1 gewaschen, wobei die Zentrifugation zwischen den einzelnen Waschvorgängen in einer normalen Laborzentrifuge über 3 min. bei 2500U/min erfolgte. Die Leukocyten-schicht (Buffy-coat) wurde jeweils möglichst vollständig abgesaugt, so daß die Ansätze nur etwa 10^3 Leukocyten/mm³ enthielten. Die Erythrocyten-Sedimente wurden dann durch Auszählen auf eine Konzentration von $1 \times 10^7 \pm 2,5 \times 10^3$ Zellen eingestellt.

2.) Antigen-Präparation

a.) Die als Antigen eingesetzte Hefe-Alkoholdehydrogenase (ADH) wurde als Kristall-Suspension von der Firma Boehringer, Mannheim, bezogen. Jeweils vor einem Versuchsansatz wurde das Enzym im Kühlraum (+ 4° C) 3 Stunden gegen 1 l isotonen Glykokoll-Phosphat-Puffer pH 8,7 (33,33 g Na-Pyrophosphat x 10 H₂O; 1,66 g Glykokoll ad 1000,0 H₂O) dialysiert, wobei das Außen-dialysat mehrfach gewechselt wurde. Konzentrationsbe-

stimmung des Fermentes nach der Biuret-Methode im Photometer Eppendorff, Faktor 17,3. Die Aktivitätsbestimmung des Fermentes erfolgte im optischen Test in der von BÜCHER und Mit. angegebenen Weise durch Absorptionsmessung bei 366 m μ (5). Da zur Bestimmung der pro Einzelzelle fixierten Zahl von Antigenmolekülen das mittlere Molekulargewicht bekannt sein muß, wurden Molekulargewichtsbestimmungen der ADH durch Messung der kohärenten Lichtzerstreuung in der Apparatur nach CANTOW durchgeführt (15); Wellenlänge des senkrecht polarisierten Lichtes (Primärlicht) 546 m μ , Beobachtungswinkel 90°, Brechungsinkrement 0,187 (55), Temperatur 20° C. Die rechnerische Auswertung erfolgte nach Extrapolation der gemessenen Streulichtintensitäten gegen die Konzentration Null (63). Die ADH-Markierung wurde in folgender Weise durchgeführt (56): In 8 ml einer auf 2° C abgekühlten, mit Ammoniak auf pH 9,4 eingestellten Lösung von Na-Sulfit-S³⁵ (zu Kontrollen oder Blindversuchen wurde nichtstrahlendes Na-Sulfit verwendet) und Kupferkomplexsalz Cu (NH₃)₄ SO₄ x H₂O wurden unter Rühren 2 ml einer 5%igen ADH-Lösung eingegeben; die Endkonzentration im Ansatz des Sulfits war 0,5 m, die des Kupfersalzes 0,02 m. Nach einer Reaktionsdauer von einer Stunde wurde bis zur Entfärbung der anfänglich blauen Lösung gegen Phosphat-Glykokoll-Puffer dialysiert (das letzte Außendialysat nach etwa 12 - 14 Stunden war frei von Radioaktivität). Die enzymatische Aktivität der ADH nimmt im Laufe der Markierung - bedingt durch die Sulfitierung der für die enzymatische Wirkung notwendigen SH-Gruppen - rasch und fast vollständig ab.

b.) Endotoxin-Aktivierung und Markierung: In Anlehnung an ein von BRANDE und Mit. angegebenes Verfahren (13, 14) wurde hochgereinigtes und lyophilisiertes Lipopolysa-

charid aus *S.abortus equi* wie folgt aufgearbeitet: Jeweils 5 mg Endotoxin wurden in 5 ml n/4 NaOH gelöst, durch 6 min langes Erhitzen bei 57° C aktiviert, mit Essigsäure neutralisiert, gegen 0,9%ige NaCl-Lösung dialysiert und das Volumen mit NaCl-Lösung auf 10 ml aufgefüllt; 1 ml dieses Ansatzes wurde dann mit 1 ml physiologischer NaCl-Lösung, 2,0 ml 0,15 m Phosphatpuffer (pH 7,2) und 1,5 ml $\text{Cr}^{51}\text{Cl}_3$ versetzt und 4 Stunden im Kühlraum gerührt, anschließend Dialyse gegen physiologische NaCl-Lösung bis die Aktivität des Außendialysats im Bereich des Nulleffektes lag.

3.) Strahlungsmessung

Die radioaktiven ADH- und Endotoxinproben wurden in einem Strahlungsmessgerät FH 90 der Fa. Friesecke und Höpfner, Erlangen untersucht, wobei die Messung der beta-Strahlung der ADH- S^{35} in einem Endfensterzählrohr, Typ 15b, Fensterdicke $1,37 \text{ mg/cm}^2$ unter konstanten geometrischen Bedingungen erfolgte. Das Versuchsmaterial - die Erythrocyten - wurde dazu im Trockenschrank bei 80° C getrocknet, anschließend im Achatmörser unter Aceton pulverisiert und als Suspension auf Aluminiumschälchen von 2 cm^2 Grundfläche in homogener beta-dicker Schicht aufgetragen. Mittlerer Messfehler für hohe Impulsraten (innerhalb des 0,95 Bereiches) $\pm 1\%$, für niedere Impulsraten $\pm 8\%$. Korrekturen für Halbwertszeiten und Koinzidenz wurden berücksichtigt, auch wurden Strahlungskontrollen mit Standardimpulsraten gemessen.

Die Gammastrahlung des Cr^{51} - Endotoxins wurde in einem Scintillationszähler mit Bohrlochkristall (FH 421) gemessen. Die Erythrocyten wurden hierzu als Suspension in physiologischer NaCl-Lösung ein-

gesetzt. Mittlerer Messfehler $\pm 1\%$. Korrekturen für Halbwertszeiten wurden, soweit erforderlich, berücksichtigt.

4.) Antigenbeladung der Erythrocyten

a.) Zur Beladung der O-Rh'Erythrocyten wurde ein konglutinierendes Testserum Anti-D (Präparat Rhescit der Behringwerke, Marburg) eingesetzt. Als Beladungskontrolle (Beladung mit Anti-D-Globulinen) diente Austestung mit Coombsserum (Hersteller: Seruminstitut Dr. Molter, Heidelberg). Im einzelnen wurde dabei so vorgegangen, daß pro ml einer 2,5%igen Erythrocyten-Suspension 1 ml Anti-D-Serum eingesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte im isotonen NaCl-Puffer pH 6,4 (je ml Erythrocyten-Sediment 2 ml Pufferlösung) über 30 min bei 37° C. Anschließend zweimalige Waschung mit je 10 ml 0,9%iger NaCl-Lösung. Für die Coombstestung wurde dann eine 40%ige Erythrocyten-Suspension hergestellt.

b.) Die Beladung der Kaninchen-Erythrocyten mit ADH-S³⁵ (bzw. ADH-S) entsprach den Angaben von STAVRITZKY und ARQUILLA (82): Pro ml einer 2,5%igen Erythrocyten-Suspension in isotoner NaCl-Pufferlösung pH 6,4 wurden 0,25 mg ADH zugesetzt und anschließend 30 min bei 37° C inkubiert. Dann wurden die beladenen Erythrocyten dreimal mit eiskalter physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und das letzte Sediment auf ein Volumen von 1,0 ml eingestellt.

c.) Für die Beladung mit Cr⁵¹-Endotoxin wurden jeweils zu $2,5 \times 10^9$ gewaschenen und in 10 ml physiologischer Phosphat-Pufferlösung suspendierten Erythrocyten 20 gamma Cr⁵¹-Endotoxin zugegeben; nach der Inkubation (30 min bei 37° C) wurden auch diese Ansätze in gleicher Weise wie oben angegeben dreimal mit je

10 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und das Sediment auf 1 ml aufgefüllt.

5.) Hämolyse-Bestimmung

Bei den Hämolyseversuchen benutzten wir ein vereinfachtes photometrisches Verfahren zur Bestimmung des Hämolysegrades: Hierzu wurde im Photometer Eppendorff die in Abhängigkeit von der erfolgten Hämolyse auftretende Änderung der Extinktion bei 546 m μ im von den Erythrocyten abzentrifugierten Serum gegenüber dem Nullwert des jeweiligen Serums (vor Inkubation mit Erythrocyten) gemessen. Die auszutestenden Erythrocyten-Chargen wurden dazu im autologen Serum suspendiert, das in Mehrfachansätzen jeweils aktiv, d. h. komplementhaltig, wie auch durch Hitzeeinwirkung komplementfrei gemacht war. Diese Ansätze wurden vor der Extinktionsmessung für definierte Zeiten (2, 4, 6 etc. Stunden) bei 4° C stengelassen. Ein derartiges Verfahren erscheint unter den hier zu berücksichtigenden Bedingungen und der gegebenen Fragestellung hinreichend genau, so daß auf spezielle Methoden der Hämoglobinbestimmung (6, 38, o.ä.) verzichtet werden konnte.

6.) Coombstestung

Die Hämagglutinationsreihen mit in typischer Weise mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnten Coombsseren und den zu testenden Erythrocyten wurden auf Testplatten nach 3 min makroskopisch abgelesen und die Änderung nach 6minütigem Warten beobachtet. Die Erythrocyten-Populationen wurden hierzu parallel mit fallender Antikörpermengung beladen und in gleicher Weise abgelesen.

7.) Pufferlösungen

Bei dem zur Austestung der pH-Abhängigkeit der Erythrocyten-Beladung verwendeten Puffersystem handelte es sich um Phosphatpuffer nach Sørensen (80, 81), wobei die Stammlösungen in folgender Weise zusammengesetzt waren: 1/15 m Monokaliumphosphat (9,08 g KH_2PO_4 pro 1 L H_2O) und 1/15 m Dinatriumphosphat (11,88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ pro 1 L H_2O). Die einzelnen pH-Stufen wurden entsprechend den Angaben des Autors hergestellt. Die Messung der Wasserionenkonzentration erfolgte in einem pH-Meter mit Glaselektrode (Fa. Beckman Instruments, München).

8.) Steroideinfluß auf die Antigen-Beladung

Bei den Untersuchungen zur Frage des Steroideinflusses auf die Beladung der Erythrocyten mit antigenem Material wurde ein lösliches Prednisolon-diäthylamino-hydrochlorid (Präparat Deltacortril der Pfizer GmbH, Karlsruhe) verwendet. Es wurden dabei pro 0,25 ml Erythrocyten-Sediment 50 gamma Prednisolon zugesetzt.

9.) Albuminversuche

Das in den Hämolyseversuchen und bei der Mehrfachbeladung eingesetzte Albumin war Human-Albumin 'reinst' der Behring-Werke, Marburg. Hiervon wurden von einer 2,5%igen Lösung in physiologischer NaCl-Lösung pro $2,5 \times 10^9$ Zellen 2,5 mg zugesetzt. Bei den Doppelbeladungsversuchen mit radioaktiv markierter ADH wurde das Albumin dagegen als 10%ige Lösung zum Ansatz gebracht, wobei wiederum physiologische NaCl-Lösung als Lösungsmittel verwendet wurde; die Endkonzentration an Albumin pro $2,5 \times 10^9$ Zellen lag hier bei 100 mg.

III Ergebnisse

Wie vorausgegangene Untersuchungen gezeigt hatten (31, 57, 58), ist eine feste in-vitro-Bindung von bestimmten in vivo antigenwirksamen Substanzen an Erythrocyten möglich. Ausgehend von diesen Untersuchungen sollte zunächst geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß die Bindung von Cr^{51} -markiertem Endotoxin und mit S^{35} -sulfitierter ADH eine pH-Abhängigkeit erkennen ließ. Wie die Untersuchungen zeigten (s. Tab. 1) war bei radioaktiv markierter ADH eine deutliche pH-Abhängigkeit der Beladungsquoten von Kaninchenerythrocyten zu erkennen. Die in Tabelle 1 mitgeteilten Daten stellen Mittelwerte aus je 4 Einzelansätzen dar.

Beladungsmilieu: Phosphat-Puffer	Fixierte Impulse/min/mg	Moleküle ADH/ Einzelzelle fixiert
pH 5,0	53,8	$6,9 \times 10^5$
pH 5,0	56,0	$7,1 \times 10^5$
pH 6,0	102,0	$12,0 \times 10^5$
pH 6,0	74,0	$8,8 \times 10^5$
pH 7,0	9,0	$1,2 \times 10^5$
pH 7,0	12,8	$1,6 \times 10^5$
Beladungsmilieu: 5,4%ige Glucose-lsg., pH 6,35, ungepuffert	11,9 9,6	$1,6 \times 10^5$ $1,4 \times 10^5$
Vorinkubation mit 100 mg Albumin in Phosphat-Puffer pH 7,0	18,0 16,0	$2,6 \times 10^5$ $2,3 \times 10^5$

Tabelle 1

Eine Berechnung der Standardabweichungen konnte nicht vorgenommen werden, da einzelne Werte verlorengegangen sind. Während die Fixation des Antigens in stark saurem Milieu und am Neutralpunkt relativ gering war, bestand ein deutliches Maximum bei pH 6,0. Hier wurden gegenüber den bei 7,0 gemessenen Impulsraten um etwa 10fach höhere Aktivitäten registriert; bei pH 5,0 lagen die von den roten Blutzellen absorbierten Antigenmengen nur bei ca. 50% des Maximums. Eine Ausweitung der pH-Skala nach der sauren oder alkalischen Seite war wegen der dann zu beobachtenden spontanen Hämolyse neigung, auch nach mehrfachen Versuchen, nicht möglich.

Bei der Prüfung der pH-Abhängigkeit der Beladung von Erythrocyten mit Cr⁵¹-markiertem Endotoxin, einer Substanz, die nach ihrer Aktivierung (s. Methodik) in hohem Masse zellaffin ist, fand sich, wie Tabelle 2 zeigt, eine, über alle von uns geprüften pH-Bereiche, etwa gleichbleibende Beladungsrate der Erythrocyten; abweichend erwies sich hier lediglich das Verhalten der im Glucosemilieu, pH 6,35, beladenen Erythrocyten, die im Gegensatz zu den Proteinantigenen eine eher etwas höhere Impulsrate aufwiesen.

Beladungsmilieu:		fixierte Impulse/min/mg	Moleküle Endotoxin/Einzelle fixiert
Phosphat-Puffer			
pH	5,0	40,5	$7,2 \times 10^3$
pH	5,0	34,0	$6,1 \times 10^3$
pH	6,0	39,0	$7,0 \times 10^3$
pH	6,0	37,2	$6,6 \times 10^3$
pH	7,0	37,2	$6,6 \times 10^3$
pH	7,0	39,6	$7,1 \times 10^3$
Beladungsmilieu: Glucose-lsg., 5,4%ig, pH 6,35, ungepuffert		50,4	$8,7 \times 10^3$
		46,3	$8,6 \times 10^3$

Tabelle 2

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluß Nebennierenrinden-Steroide auf die Bindungsverhältnisse haben, da im Schrifttum mehrfach über eine gewisse Schutzfunktion von Prednison bzw. seinen Derivaten auf die Erythrocytenmembran bei cytotropen immunologischen Reaktionen berichtet wurde (s. Diskussion). Bei diesen Versuchen wurden den Suspensionsmedien Prednisolon bzw. phosphoryliertes Prednisolon zugesetzt.

Beladungsmilieu: Phosphat-Puffer	Fixierte Impulse/min/mg	Moleküle Endotoxin/Einzelle fixiert
pH 6,4	38,2	$6,8 \times 10^3$
pH 6,4	36,1	$6,4 \times 10^3$
pH 7,5	38,8	$6,9 \times 10^3$
pH 7,5	37,2	$6,6 \times 10^3$
Vorinkubation mit	38,6	$7,0 \times 10^3$
Prednisolon (Ph.Puffer pH 6,4)	39,2	$7,0 \times 10^3$
Vorinkubation mit phosphoryliertem Prednisolon (Ph.puffer pH 6,4)	39,2 39,0	$7,1 \times 10^3$ $7,0 \times 10^3$

Tabelle 3

Wie die Ergebnisse in Tabelle 3 erkennen lassen, kommt es unter Standardbedingungen durch Zugabe der Steroide zu einer wegen der Geringfügigkeit des Effektes nur als fraglich zu bezeichnenden Erhöhung der Impulsraten.

In weiteren Untersuchungen wurden Human-Erythrocyten der Blutgruppe O, Rh mit Anti-D-Protein inkubiert, wo-

bei die Austestung nach COOMBS in der oben angegebenen Weise (s. Methodik) als Kontrolle eines Beladungseffektes diene.

Wie zu erwarten, kam es dabei zu einer festen Adsorption zwischen dem zellwandeigenen Rh-Antigen und dem im spezifischen Anti-Serum enthaltenen Antikörper, wobei der Endtiter im unverdünnten Ansatz bei 1:256, fraglich bei 1:512, lag. Wurde das Anti-Serum vor der

Anti-D-Serum: voll, bzw. mit 0,9%iger NaCl- Lsg. verdünnt	Coombsverdünnungen									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
voll	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	Ø	
1:2 verdünnt	+++	+	++	++	++	++	+	Ø	Ø	
1:3 verdünnt	Ø	Ø	Ø	Ø	(+)	(+)	Ø	Ø	Ø	
1:4 verdünnt	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	
1:5 verdünnt	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	

Tabelle 4, Prednison-Vorinkubation

Inkubation 1:2 verdünnt, so blieb der Endtiter bei der Kontrolle (s. Tabelle 5, Zeile 2) bei 1:256. Wurde der Antikörpergehalt weiter gesenkt, so blieb bei einer Verdünnung von 1:3 die Coombstestung bis zu einem Endtiter von 1:128 positiv, die weiteren Verdünnungen (s. Tabelle 5, Zeile 4 und 5) ergaben negative Coombs-teste. Waren demgegenüber die antigenträgenden Erythrocyten vor der Zugabe des Antiserums mit Prednison vorinkubiert (0,2 mg / ml Erythrocyten-Sediment), so konnten eindeutig positive Agglutinationen (s. Tabelle 4) nur noch in der zweiten Verdünnungsstufe registriert werden; die dritte Verdünnungsstufe ergab nur fraglich positive Ergebnisse bei Titer 1:32 und

Anti-D-Serum: voll, bzw. mit 0,9%iger NaCl- Lsg. verdünnt	Coombsverdünnungen								
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
voll	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	(+)
1:2 verdünnt	++	++	+++	++	++	++	+	+	Ø
1:3 verdünnt	Ø	Ø	+	+	+	+	+	Ø	Ø
1:4 verdünnt	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
1:5 verdünnt	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø

Tabelle 5, Kontrolle

und 1:64. Eine pH-Verschiebung des Inkubationsmilieus durch die Zugabe der Steroidhormone konnte ausgeschlossen werden.

In weiteren Ansätzen wurden Doppelbeladungen mit dem Lipopolysaccharid aus *S.abortusequi*, wie auch mit der ADH durchgeführt; es sollte hierdurch geklärt werden, ob am Erythrocyten für unterschiedliche Antigene auch differente Haftreale gegeben sind oder ob die Bindung z. B. des Proteinantigens durch vorherige Adsorption des Endotoxins blockiert werden kann. Diese Ansätze wurden parallel laufend mit und ohne vorherige Behandlung der Erythrocyten mit Prednison untersucht.

Die Ergebnisse der Radioaktivitätsmessung (s. Tabelle 6) über den nach Versuchsende isolierten Erythrocyten weisen daraufhin, daß eine wesentliche Beeinflussung der ADH-Adsorption durch vorangegangene Endotoxin-Bindung nicht auftritt; die entsprechenden Impulsraten liegen im gleichen Bereich. Ein eindeutiger Effekt des Prednisons auf die Beladung ließ sich auch bei dieser Versuchsanordnung nicht nachweisen.

Beladungsmilieu:	Fixierte im-	Moleküle ADH/
0,9%ige NaCl-Puffer-	pulse/min/mg	Einzelzelle
lösung, pH 6,4		fixiert
Erythrocyten vorinkubiert	20,0	$2,7 \times 10^5$
mit Cr ⁵¹ -Endotoxin, an-	19,4	$2,6 \times 10^5$
schließend ADH-S ³⁵ Beladung		
Erythrocyten vorinkubiert	21,2	$2,9 \times 10^5$
mit Prednison, dann ADH-S ³⁵ -	20,6	$2,7 \times 10^5$
Beladung		
Leerwert: Erythrocyten leer	19,8	$2,7 \times 10^5$
vorinkubiert, dann ADH-S ³⁵ -	20,2	$2,7 \times 10^5$
Beladung		
ADH-S ³⁵ und Prednison ge-	20,4	$2,7 \times 10^5$
meinsam vorinkubiert, dann	20,6	$2,7 \times 10^5$
Inkubation mit Erythrocyten		

Tabelle 6

Zuletzt sollen die Ergebnisse der Hämolyseversuche im autologen Serum mitgeteilt werden. Hierzu wurden die in üblicher Weise beladenen Erythrocyten-Populationen bis zu maximal 24 Stunden in vorher gewonnenem autologen Serum, das entweder durch Hitze dekomplementiert oder aktiv war, inkubiert und die auftretende Hämolyse durch Messung der Extinktion bei 546 mμ bestimmt. Zu jedem Versuch wurden Kontrollen mit unbeladenen Erythrocyten eingesetzt.

Nachzutragen bleibt, daß bei diesen Versuchen das Protein- wie auch das Lipopolysacharid-Antigen nicht radioaktiv, sondern nur blind markiert verwendet wurde. Die mitgeteilten Ergebnisse resultieren aus Einzelversuchen, so daß eine statistische Sicherung

der zu beobachtenden stärkeren Hämolyse neigung bei antigenbeladenen Erythrocyten und die daraus zu ziehende Folgerung, daß diese Zellen einem verstärkten Untergang anheimfallen, erst durch eine größere Zahl von Versuchen zu erbringen wäre.

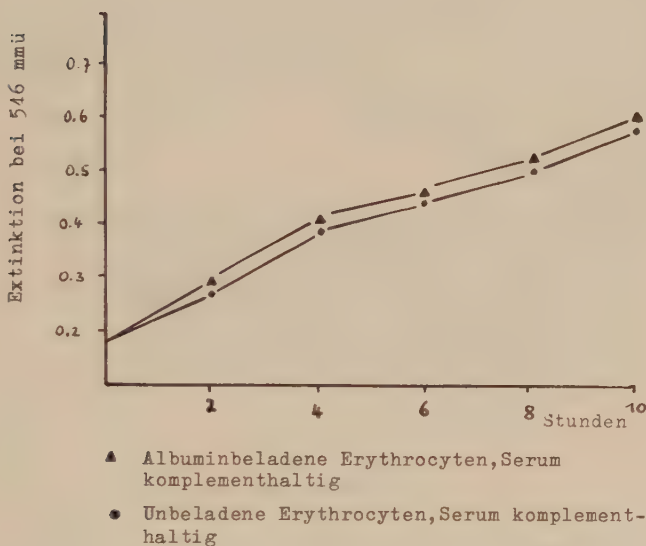


Abbildung 1

a.) Wie aus Abbildung 1 und 2 hervorgeht, ist die nach Inkubation der Kaninchen-Erythrocyten mit Human-Albumin zu beobachtende Hämolyse gegenüber der Kontrolle nur gering vermehrt. Ob es sich hierbei überhaupt um einen echten Beladungseffekt handelt, muß zweifelhaft bleiben, da einerseits die Beladung mit Fremdalbumin im Allgemeinen nur gering und zum anderen auch die Inkubationszeit von nur 10 Stunden nicht ausreicht um stärkere Effekte hervortreten zu lassen.

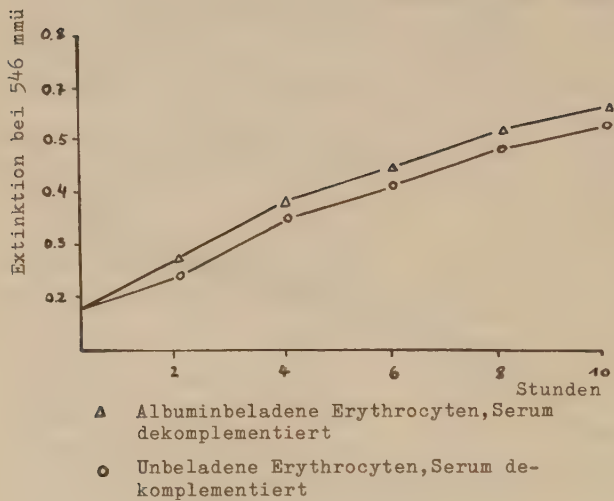


Abbildung 2

b.) Demgegenüber ließ sich bei den mit ADH beladenen Erythrocyten eine gegenüber der Norm deutlich gesteigerte Hämolyse beobachten, zumindest gilt dies für die 8 Stunden-Werte (vergleiche hierzu Abb. 3 und 4). Deutlicher werden die Differenzen, wenn wie in Abbildung 5 und 6 das Verhalten der Erythrocyten über längere Zeit beobachtet wird; nach 24 Stunden findet sich dann eine über 50% stärkere Zerstörung der Zellen.

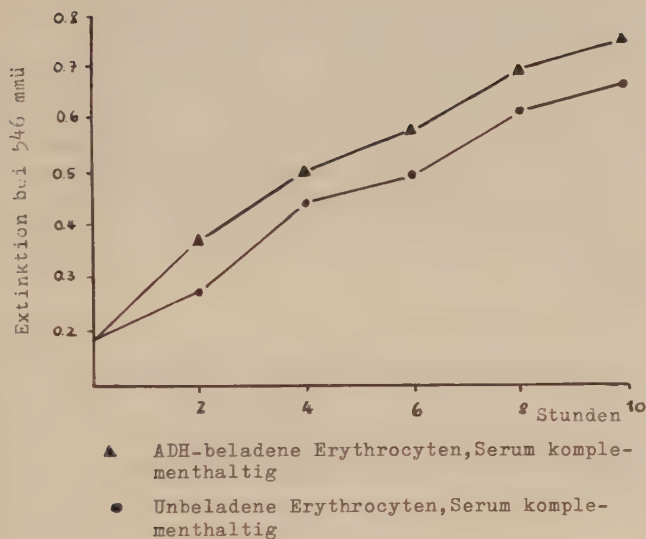


Abbildung 3

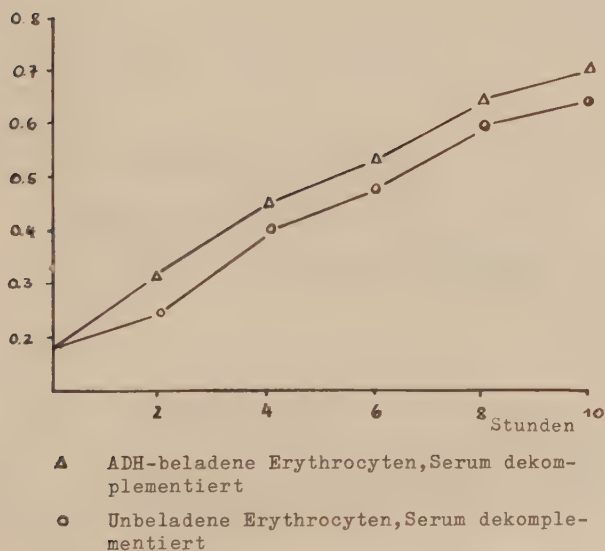


Abbildung 4

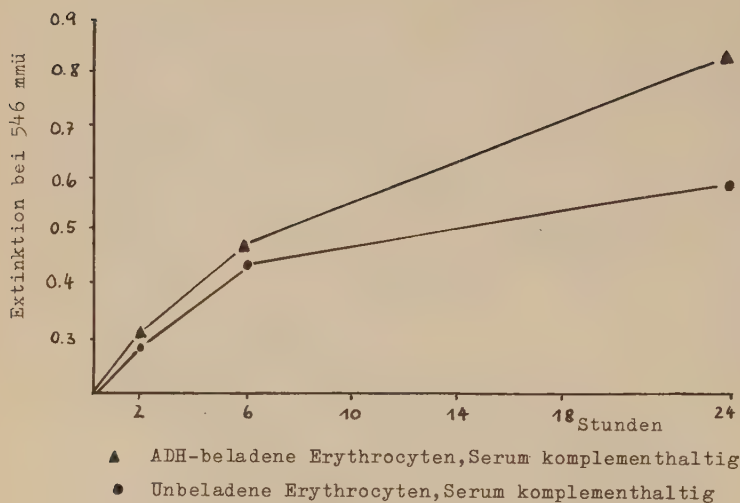


Abbildung 5

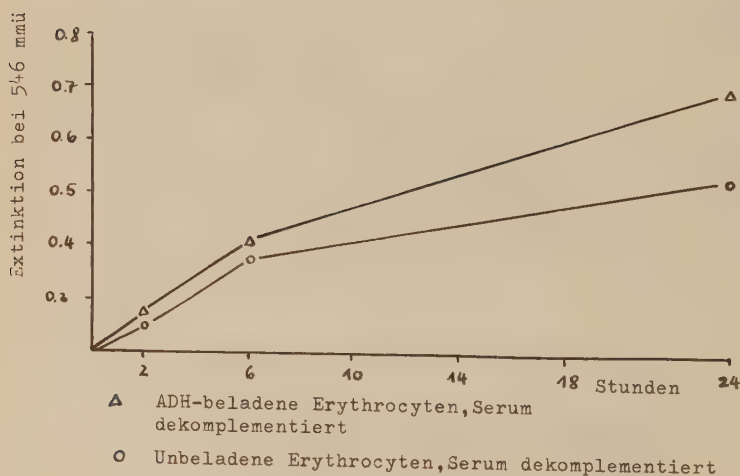


Abbildung 6

c.) Besonders ausgeprägt war die Hämolyseneigung bei den lipopolysacharid-beladenen Zellen, die schon im 6 Stunden-Wert erkennbar wird, auffallend stark aber - wie bei den ADH-Versuchen - nach 24 Stunden zu registrieren war; diese Werte lagen 70% höher als die Kontrollwerte. Da zudem auch die Erythrocyten in dekomplementiertem Serum nach Endotoxinbelastung eine erheblich gesteigerte Hämolyseneigung aufwiesen, wird man eine generelle Zellschädigung annehmen müssen (s. Abb. 6 und 7).

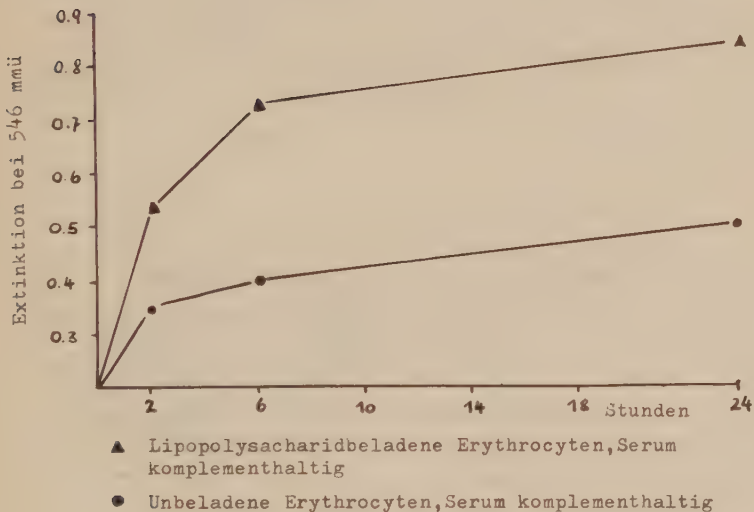


Abbildung 7

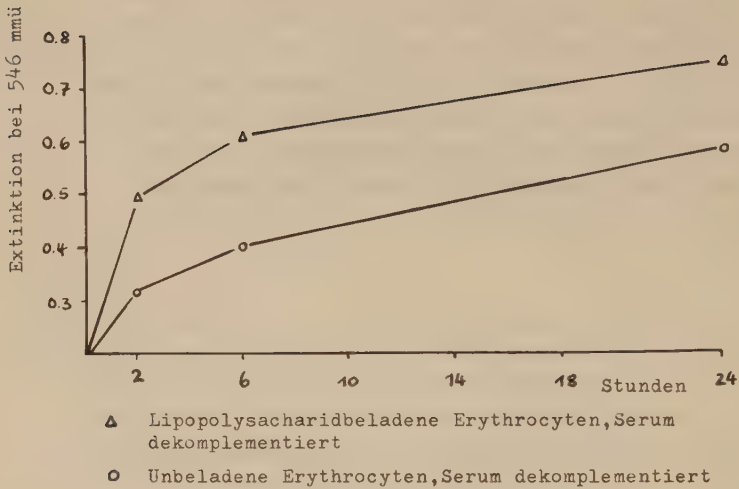


Abbildung 8

d.) Eine ähnlich gesteigerte Neigung zu hämolytischen Störungen war auch bei den Versuchen an Human-Erythrocyten nach Inkubation mit anti-körperhaltigem Serum (Anti-D-Serum) zu beobachten. Nach 6 Stunden wie auch nach 18 Stunden fanden sich sowohl im komplementhaltigen wie auch im dekomplementierten Serum gegenüber den Blindansätzen erhöhte Extinktionswerte.

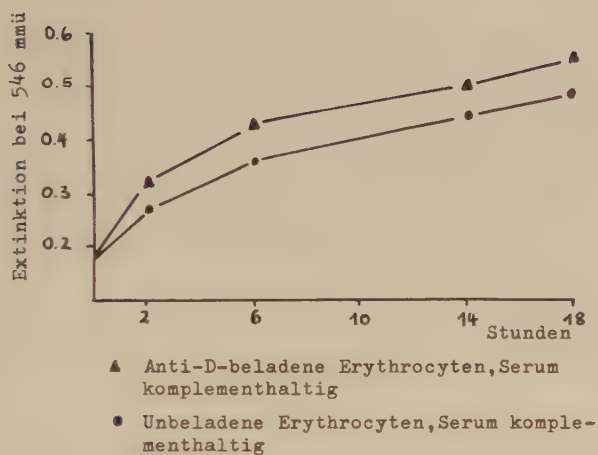


Abbildung 9

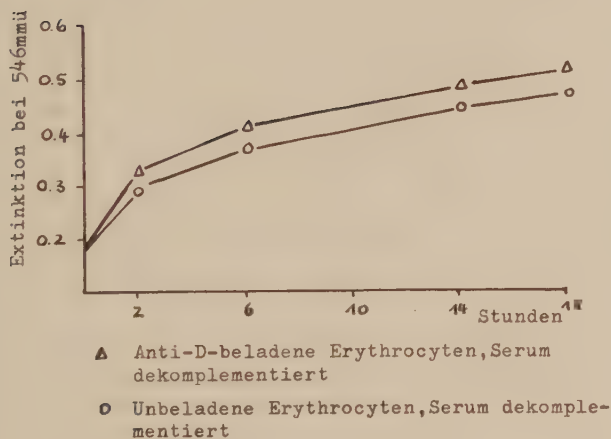


Abbildung 10

Da bei den hämolytischen Anaemien mit einer Änderung der Gestalt des Erythrocyten, insbesondere dem Auftreten von Kugelzellen, gerechnet werden muß, wäre es an sich interessant gewesen an unbeladenen und beladenen Zellen Price-Jones-Kurven zur Durchmesserbestimmung aufzunehmen; diese Versuche scheiterten jedoch aus methodischen Gründen, da die beladenen Erythrocyten meistens verklumpten und somit nicht genügend repräsentative Einzelzellen erfaßt werden konnten.

IV Diskussion

Die in den letzten Jahren in immer stärkerem Maße vorangetriebene hämatologische Analysentechnik hat zur Entdeckung einer Vielzahl von hämolytischen Reaktionen bei den verschiedensten Krankheitsbildern und gleichzeitig zur Aufdeckung zahlreicher, bisher unbekannter, durch Erythrocytenzerfall gekennzeichnete Bluterkrankungen geführt. Hierbei fand sich, daß im Rahmen erworbener hämolytischer Erkrankungen außer einer Reihe chemischer Substanzen, unter diesen auch Pharmaka, immunologische Reaktionen am Erythrocyten angreifen können.

Unberücksichtigt sollen bei der nun folgenden Aufzählung alle diejenigen hämolytischen Krankheitsbilder bleiben, die eine andere als die oben erwähnte immunchemische Ursache haben. Durch diese etwas willkürliche Auswahl soll der Gegenstand dieser Untersuchung hervorgehoben werden. Unter den erworbenen hämolytischen Anaemien mit einem zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus sind heute bekannt: zunächst die durch Isohäm-Antikörper bedingten, wobei hierzu der Morbus haemolyticus neonatorum und der hämolytische Transfusionszwischenfall gehört (4). Weiterhin sind hier die durch Autohäm-Antikörper hervorgerufenen hämolytischen Erkrankungen, so die häm. Anaemie durch inkomplette Wärme-Auto-Antikörper, die Kälteagglutinininkrankheit und letztlich die paroxysmale Kältehämoglobinurie durch bithermische Hämolsine zu erwähnen (24, 77, 78). Wenngleich die Untersuchungen zu diesen Krankheitsbildern schon älteren Datums sind, so wurden doch ergänzende Befunde hierzu erst in neuerer Zeit geliefert.

Erst in jüngerer Zeit durchgeführten immunologischen Untersuchungen ist die Aufdeckung arzneimittel-allergischer Erkrankungen mit autohämolytischen Krisen zu verdanken. Zwar konnte bisher erst an wenigen Bei-

spielen der immunologische Mechanismus nachgewiesen werden, doch sollen diese Formen nicht unerwähnt bleiben. So konnte HARRIS (33) bei Fuadingsaben und FREEDMAN (29) bei Chinidinsulfatverabreichung beobachten, daß trotz zwar komplikationslos vertragener Erst-Medikation, es bei einer erneut durchgeführten konsequenten Therapie zu akuten hämolytischen Krisen kam. Es war bei den Patienten serologisch ein Faktor nachweisbar, der in Verbindung mit den erwähnten Pharmaka eine hämagglutinierende oder hämolysierende Wirkung entfaltete. Ähnliche Hämolysemechanismen wurden auch von anderen Untersuchungen angegeben (47, 53, 62).

Weiterhin seien solche hämolytische Anaemien genannt, bei denen es durch direkte Einwirkung von chemischen Substanzen, hierbei wiederum auch Pharmaka, oder aber auch durch das Einwirken bakterieller Toxine zu einer direkten Schädigung der erythrocytären Membran kommen könnte. Ein akuter Zerfall primär normaler Erythrocyten ist bei der Einwirkung von Methylchlorid, HCl, Arsenwasserstoff und Kaliumchlorat bekannt. Auch bei Pilzintoxikationen sind hämolytische Krisen geläufig, so z. B. bei *Helvella esculenta*-Vergiftung (53). Ein akuter Blutzerfall ist weiterhin bei Gasbrandsepsis gesichert, gelegentlich wurde er auch bei anderen Septicaemien beobachtet (23); auch das Invasionsstadium des Oroyafiebers (*Bartonella bacilliformis*) weist gelegentlich eine stärkere hämolytische Komponente auf (70). Eine direkte Alteration der erythrocytären Membran wird auch bei schweren Verbrennungen angenommen, wobei ja mitunter auch hämolytische Krisen gesehen werden (39, 76). In diesem Zusammenhang ließen sich im Objektträger-Test bei Erhitzung über 49° C sphärische Partikel nachweisen (76). Von einem Teil der Untersucher wird auch Tumoren eine direkte oder indirekte Alteration der erythrocytären Membran zuge-

schrrieben (71).

Zuletzt sei noch auf die Hämolyse bei Polyagglutinabilität der roten Blutkörperchen hingewiesen. Hierbei nimmt man an, daß unter der Einwirkung von Bakterienstoffwechselprodukten der sog. T-Rezeptor aktiviert wird, der dann mit einem im Serum enthaltenen Agglutinin reagiert. Wie vanLOGHEM und Mit. beobachten konnten, kam es auch in vivo bei Bakteriaeämie zu hämolytischen Krisen, wobei dieser Entstehungsmechanismus diskutiert wird. Die Fähigkeit der Aktivierung des T-Rezeptors wird auch für Viren und chemische Substanzen angenommen (49, 83).

Von besonderem Interesse ist es nun, welche Vorstellungen darüber existieren wie es im Verlaufe einer der oben genannten immunologisch-bedingten, hämolytischen Anaemien zu einer Antikörperbildung kommen kann. Wie Schubotho speziell für die inkompletten Wärme-Auto-Antikörper diskutiert (77), sind folgende Möglichkeiten denkbar:

a.) Es wäre vorstellbar, daß während der Embryonalperiode eine ungenügende immunologische Toleranz erworben wird und diese später im Rahmen einer somatischen Mutation des Antikörperproduzierenden Gewebes verlorenght.

b.) Belebte Krankheitserreger, ihre Stoffwechselprodukte oder Tumorstoffwechselprodukte könnten gewisse Strukturen der Patientenerythrocyten in der Weise modifizieren, daß sie antigene Eigenschaften bekommen und Antikörper auf den Plan rufen, die durch Übergreifen auch mit dem unveränderten Rezeptor reagieren. Es läge hierbei streng genommen allerdings keine Auto-Immunsierung vor.

c.) Als weitere Möglichkeit wird angenommen, daß körperfremde Substanzen, die im Rahmen eines Infektes in den Organismus eindringen oder bei einer neoplastischen Wucherung endogen entstehen, eine Antikörperbildung veranlassen, wobei eine Reaktion nicht nur mit dem Antigen, sondern auch zufällig mit den Erythrocyten stattfindet. Die Erythrocyten wären hierbei nur zufällig in die immunologische Reaktion mit einbezogen.

d.) Als letzte Möglichkeit ist zu diskutieren, daß von den Eiweißproduktionsstellen des Organismus unter gewissen Bedingungen, wie z. B. ein exogener infektiöser Reiz, unspezifische, nicht-immunogene Substanzen gebildet werden, die mit körpereigenen Erythrocyten reagieren. Hier wäre jedoch kein Immunisierungsprozeß gegeben, sondern es würde sich um den Spezialfall einer Paraproteinaemie handeln.

Man erkennt, daß zwar Vorstellungen über den Entstehungsmechanismus von antierythrocytären Antikörpern, eindeutige Beweise hierzu jedoch nicht vorhanden sind. Diese vorwiegend vom immunologischen Standpunkt geführte Diskussion bedarf noch einer Ergänzung. Wie schon oben erwähnt, vermutet DUESBERG, daß dem Erythrocyten die Fähigkeit zukommen könnte, in den Organismus eingedrungenes antigenes Material durch Adsorption oder chemische Bindung an die Membran der roten Blutkörperchen abzufangen und so die weitere Verarbeitung der Antigene modifiziert würde. In Analogie zu den oben wiedergegebenen Hypothesen über die Entstehung der inkompletten Wärme-Auto-Antikörper, wäre es denkbar, daß durch die in den Kreislauf gelangten Antigene, gleich welcher Herkunft, eine Modifizierung der Erythrocyten-Membran stattfindet. Diese könnte einerseits ohne konsekutive Antikörperbildung lediglich einer erweiterten Resi-

stenz entsprechen oder aber Ausdruck einer echten Immunisierung sein. Hierbei käme dann von der Infektabwehr her gesehen oder allgemeiner von der Antigenverarbeitung des Organismus dem Erythrocyten ein bisher wenig beachteter Platz zu. Die Frage, ob hier körpereigene Zellen, in diesem Fall die Erythrocyten, zwecklos geopfert werden, oder ob sie in einem sinnvollen Abwehrmechanismus stehen, läßt sich im Rahmen dieser Arbeit nicht beantworten. Ihr Anliegen ist vielmehr, ausgehend von den Überlegungen DUESBERGs zu prüfen unter welchen physikalisch-chemischen Bedingungen und in welcher Menge Modell-Antigene am Erythrocyten fixiert werden können, wobei auch die Annahme bestand, daß bei den durchgeführten Versuchen der Modellfall einer erworbenen hämolytischen Anaemie gegeben sei und so ein Beitrag zu deren Aethiopathogenese geleistet werden könnte.

Werden Kaninchen-Erythrocyten unter den oben angegebenen Bedingungen in gepufferter Lösung mit markierter ADH inkubiert, so kommt es zu einer messbaren recht beträchtlichen, unter verschiedenen Testbedingungen reproduzierbaren Bindung des Modell-Antigens ADH. Als eine wesentliche Messgröße wurde bei den Versuchen die Abhängigkeit der Fixation von der Wasserstoffionenkonzentration des Testmilieus beobachtet. So fand sich, daß vorwiegend im sauren Milieu im Bereich von pH 6,4 ein deutliches Optimum der Beladung lag. Wie in einem anderen Zusammenhang von Ruhenstroth-Bauer gezeigt worden war, kommt der Menge an angebotenen Protein für die Fixation eine wesentliche Rolle zu, gleichzeitig darf die Ionenstärke des Inkubationsmilieus nicht zu hoch liegen. Mit steigender Ionenstärke sinkt die Beladung (64). In Übereinstimmung mit Stavritzky und Arquilla ergab sich die günstigste Ausbeute, wenn pro $2,5 \times 10^9$ Zellen 2,5 mg Fremdprotein zugesetzt wurden; dies konnte in Vorversuchen bestätigt werden.

Es wäre nun denkbar, daß es sich bei der im Experiment beobachteten Fixation um eine rein passagere Anlagerung von Fremdprotein an den Erythrocyten handeln könnte, die jederzeit unter entsprechenden Bedingungen reversibel wäre. Hierzu kann folgendes gesagt werden: Erythrocyten, die mit ADH-S³⁵ beladen waren, wiesen im, nach viermaligem, intensiven Waschen und anschließendem osmotischen Schaukeln in Fleischer'scher Lösung erhaltenen Stroma-Sediment (durch hochtouriges Zentrifugieren gewonnen) 50 - 55% der ursprünglichen Radioaktivität auf. Diese trotz der intensiven Behandlung hohe Radioaktivität läßt auf eine relativ feste Bindung des Modell-Antigens an die Membran schließen, die vermutlich wenigstens z. T. durch die bei dem gegebenen sauren Milieu bedingte Ionisierung der Thiosulfatgruppen und der daraus folgenden chemischen Affinität hervorgerufen wird.

Die Untersuchungen zur Beladung mit Cr⁵¹-markiertem Endotoxin ließen erkennen, daß es bei diesem außerordentlich zellaffinen Antigen zu einer Beladung kam, die unabhängig vom vorgegebenen pH-Milieu war. Sowohl im nachprüfbaren alkalischen wie auch sauren Bereich kommt es zu einer gleichbleibenden Aufladung, so daß offensichtlich hier die Membranbeschaffenheit, was die Ionisierung angeht, ohne Einfluß auf die Fixierung ist. Es scheint auch keine Rückwirkung vom Puffer auf das Endotoxin gegeben zu sein. Wie sich an praktisch hämoglobinfrei gewaschenen Stromata zeigen ließ, finden sich hier noch 33% der ursprünglich gemessenen Radioaktivität, so daß auch hierbei auf eine feste Bindung des Antigens geschlossen werden dürfte, ohne daß die Bindungsart näher charakterisiert werden könnte. Ergänzend darf hier noch angeführt werden, daß es sich bei dem Endotoxin um eine Substanz handelt, die bei entsprechender Herkunft eine erhebliche klinische

Bedeutung besitzt. Wie aus den seither durchgeführten Untersuchungen hervorgeht, wird eine Verarbeitung der Endotoxine im menschlichen Organismus nur durch Makrophagen bzw. einen enzymatischen Serumfaktor angenommen (34, 72), ohne daß letztliche Klarheit bestünde.

Zum Problem der Doppel- oder allgemeiner einer Mehrfachbeladbarkeit der Erythrocyten-Membran mit antigenem Material ergaben die mit Albumin und ADH durchgeführten Versuche, daß vorangegangener Inkubation mit Albumin eine gegenüber Kontrollen gleich hohe Beladbarkeit mit ADH resultiert, so daß für beide Substanzen offensichtlich keine Konkurrenz um spezifische Haftareale besteht. Hierbei ist zu bedenken, daß unter Umständen die Bindung des Albumins leicht reversibel ist, so daß es auch ohne Schwierigkeiten von der ADH verdrängt werden könnte. Um in dieser Frage weitere Klärung zu erhalten, wurde geprüft, ob bei gemeinsamen Angebot von ADH und Endotoxin im Inkubationsmilieu eine Änderung in der Beladbarkeit zu beobachten war. Die Versuchsbedingungen wurden hierbei so angelegt, daß auch mögliche Reaktionen zwischen ADH und Endotoxin im Inkubationsmilieu erfaßt werden konnten, wo-bei hier die Überlegung möglicher intravasaler Reaktionen bestimmend war. Die gemessenen Impulsraten für die ADH lassen im Vergleich mit den bei Standardinkubationsbedingungen und getrenntem Angebot gewonnenen Daten keine Minderbeladung erkennen. Diese Befunde lassen vermuten, daß die erythrocytäre Membran als ein polyvalenter Rezeptor gelten muß, wobei Haftstellen für die unterschiedlichsten Stoffgruppen anzunehmen sind. In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß die Erythrocyten ja auch physiologischerweise intravasal mit den verschiedensten Proteinen in Kontakt gersten können.

Wie aus Untersuchungen von KABAT und LANDSTEINER hervorgeht, finden sich am O-Rh-Erythrocyten antigene Orte, an die sich unter entsprechenden Bedingungen in Anti-D-Serum enthaltene Antikörper anzulagern vermögen (40). Ein Nachweis dieser Anlagerung erfolgt durch den direkten Coombstest (17, 18). Die Fragestellung des hier durchgeführten Versuches bestand darin, ob sich die Anlagerung von Anti-D-Antikörpern durch Nebennierenrinden-Steroiden modifizieren läßt. Als Kontrolle diente die Combs-Testung Anti-D-beladener O-Rh-Erythrocyten. Eine eingehende Diskussion dieses Punktes erfolgt später.

Die Versuche zur Mehrfachbeladung legen den Gedanken einer Diskussion über die Größe der erythrocytären Membran und ihrer theoretisch möglichen Besetzung mit Fremdmaterial nahe. Setzt man nach WINTHROBE die Oberfläche des Erythrocyten zu $1,4 \times 10^{10} \text{ \AA}^2$ (90), so ergeben sich rein rechnerisch, wählt man als Beispiel die ADH, folgende Verhältnisse: nimmt man für das ADH-Molekül eine Haftfläche bzw. einen sterischen Flächenbedarf von etwa $3 \times 10^{10} \text{ \AA}^2$ an, so ergibt sich, daß ein zu 100% beladener Erythrocyt maximal knapp 5×10^6 Antigen-Moleküle aufnehmen könnte. Demgegenüber fand sich in den durchgeführten Versuchen maximal eine Bindung von $1,2 \times 10^6$, d. h. es ließen sich nur ca. 24% der Erythrocyten-Gesamtoberfläche beladen. Die vergleichbaren Angaben für die maximale Beladbarkeit der Erythrocyten-Oberfläche mit Lipopolysaccharid können auf Grund eigener Untersuchungen nicht mitgeteilt werden, da die für die Berechnung erforderlichen Daten (z. B. Molekulargewicht, molekulare Gestalt) nicht zur Verfügung standen. Eine prozentual gesehen ähnlich hohe Beladbarkeit der Erythrocyten-Membran wie für die Hefe-ADH ergibt sich aus Untersuchungen anderer Autoren: So fanden HOTCHIN et al. nach elektronenoptischen Messungen, daß ca. 10 000 Influenza-Viren auf einem Erythrocyten Platz finden, wobei die Bindung

von 300 Virusmolekülen einer 1%igen Beladung entspricht (3, 36). Des weiteren ist aus Arbeiten von MASOUREDIS und BOURSNEEL bekannt, daß sich auf entsprechenden O-Rh-Erythrocyten ca. $5 - 10 \times 10^3$ antigene Orte finden (die betreffenden Studien wurden mit J^{131} -markiertem Anti-D-Serum durchgeführt) (10, 52). Nach KABAT besitzen A_1B -Erythrocyten 5×10^5 B-Receptoren, eine Zahl die vermutlich zu hoch liegen dürfte (40). Zur Übersicht ist im folgenden eine von MOHRING (60) veröffentlichte Tabelle über die maximal erreichbare Beladbarkeit wiedergegeben:

Substanz	Maximal erreichbare Beladbarkeit (Moleküle/Erythrocyt)
Albumin	4×10^4
Hefe-ADH	$2,1 \times 10^5$
Lipopolysacharid	10^5
Influenza-Viren	3×10^2 (1% d.Ob.fl.)
Polyvinyl-Pyrrolidon	10×10^6 (100% d.Ob.fl.)

Tabelle 7

Vergleicht man die angebotenen Mengen an Lipopolysacharid mit denen der ADH, so glaubt man aus dem nur im gamma-Bereich liegenden Angebot an Endotoxin gegenüber dem im Milligramm-Bereich liegenden der ADH schließen zu können, daß dem Endotoxin eine erheblich größere, und zwar stofftypische Zellaffinität zukommt. In gleicher Richtung deutet auch die pH-Unabhängigkeit der Beladung mit Endotoxin innerhalb des von uns geprüften pH-Bereiches. Ähnliche Angaben über die hohe Affinität von Endotoxin aus *E.coli* an die erythrocytäre Membran finden sich bei LÜDERITZ et al. (50). Dem Protein-

antigen dagegen ist es nur unter wohldefinierten Bedingungen möglich die Erythrocytenmembran zu besetzen. Ein wesentlicher Faktor für dieses unterschiedliche Verhalten, der von uns untersuchten Modellantigene dürfte in deren unterschiedlicher chemischer Struktur begründet sein. Bei dieser Frage ist weiterhin zu bedenken, daß auch die Membranmoleküle des Erythrocyten durch die Wasserstoffionen-Konzentration des umgebenden Milieus in ihrem Dissoziationsgrad differieren. Auf diese Frage wurde bereits oben bei der Diskussion der ADH-Beladung eingegangen. Daß die Bindung der im Anti-D-Serum vorhandenen spezifischen Antikörper an die entsprechenden Membranbezirke fest war, und allgemeinen immunologischen Gesetzen gehorcht, erfordert keine nähere Diskussion (17, 18, 40). Für die Bindung des Albumins wird man nach den bisherigen Erfahrungen nur eine lockere, unspezifische Adsorption annehmen können. Ganz prinzipiell läßt sich sagen, daß jede Phasengrenzfläche, in unserem Fall die Erythrocytenoberfläche, als fest-flüssige Substanz gegenüber dem umgebenden flüssigen Medium infolge des sich ausbildenden Grenzflächenpotentials zur Adsorption praedestiniert ist. Darüber hinaus können im Fall des Erythrocyten auch noch andere z. B. die durch die negative Oberflächenladung bedingten Kräfte für die Bindung der gelösten Bestandteile aus dem umgebenden Medium heraus verantwortlich sein.

Nimmt man auf Grund der bisher diskutierten Ergebnisse und der mitgeteilten Literatur eine Beladbarkeit der Erythrocytenmembran mit Fremdmaterial als gegeben an, so ergibt sich hierbei die Frage, wie sich diese morphologisch veränderten Zellen im Vergleich mit normalen, d. h. unbeladenen Erythrocyten, hinsichtlich der Hämolyseanfälligkeit verhalten. Wie bereits erwähnt, weisen die beladenen Zellen mikroskopisch eine Deformierung auf, so daß, vom morphologischen her der Verdacht einer verstärkten Hämolyse gegeben scheint. Erwähnt sei hier eine

Beobachtung, nach der mit Lipopolysacharid beladene Erythrocyten verstärkt agglutinieren und im komplementhaltigen Serum einer Lyse anheimfallen (9). Im Experiment ließ sich nun beobachten, daß in vitro beladene Erythrocyten bei länger dauernder Beobachtung im autologen Serum eine gegenüber unbeladenen Kontrollen verstärkte Hämolyse aufweisen. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß MOHRING et al. mit der Cr^{51} -Methode eine verkürzte Lebensdauer von Erythrocyten, die mit ADH oder Lipopolysacharid beladen waren, nachweisen konnte (32). Es wurde hierbei gefunden, daß die Hämolyserate bei Lipopolysacharid-beladenen Zellen höher als bei den ADH-beladenen war. Auch bei Anti-D-Antikörperbeladenen Erythrocyten zeigten sich bei unseren Versuchen gesteigerte Hämolysewerte gegenüber den unbeladenen Kontrollen. Der geringe, nach Albumin-Inkubation gefundene Hämolyseeffekt dürfte unspezifischer Art sein. Aus dem Verlauf der Kurven glaubt man die Abhängigkeit vom Vorhandensein von Komplement entnehmen zu dürfen. Vom Methodischen wäre zu bedenken, ob nicht die häufigen Waschvorgänge einen Einfluß auf die Hämolyse nehmen könnten. Wie H. PLENZIG beobachtete, zeigten für Transfusionszwecke fünfmal gewaschene Erythrocyten keine Verkürzung der Lebensdauer (66). Makroskopisch war bei unseren Versuchen nach Beendigung der Waschvorgänge keine Hämolyse zu beobachten. Wenngleich auch die Einschränkung gemacht werden muß, abgesehen von der Beladung mit Anti-D-Antikörper, daß die Befunde an Kaninchen-Erythrocyten erhoben wurden, so dürfte es sich hier doch um den Modellfall einer erworbenen hämolytischen Anaemie handeln.

Funktionelle Änderungen, vor allem was den Stoffwechsel angeht, finden sich im Schrifttum nur im Zusammenhang mit Beobachtungen an Antikörper-beladenen Erythrocyten. Wie STORTI et al. nachweisen konnte, sinkt nach Adsorption inkompletter Antikörper gleichzeitig die Atmung und die

osmotische Resistenz der roten Blutkörperchen ab (84). Ähnliche Beobachtungen bei antigenbeladenen Erythrocyten liegen nicht vor. Da es auf Grund der Beladung zu einer Schädigung der Erythrocytenoberfläche kommen könnte, elektronenoptische Untersuchungen sprechen hierfür (65), verdient noch eine Beobachtung von DANON et al. Erwähnung, der akute hämolytische Episoden bei Patienten mit familiär vorkommenden ultrastrukturellen Membranabnormitäten sah (22).

Von der Vorstellung ausgehend, daß Erythrocyten zur Antigenfixation und zu einer Modifikation derselben befähigt sind, spielt vom Klinischen her gesehen die Frage einer Überladung oder anders ausgedrückt der Schutz des Erythrocyten vor derselben eine nicht unwesentliche Rolle. Vom theoretischen her ist an eine mögliche Wirkung der Nebennierenrinden-Steroide zu denken, da diese ja von einer ähnlichen Vorstellung ausgehend bei hämolytischen Anaemien eingesetzt werden. Es bestehen hierbei folgende Vorstellungen über eine mögliche Wirkung der Steroide (87):

- 1.) Verminderte Produktion von Auto-Antikörpern
- 2.) Dämpfung der Milzfunktion
- 3.) Hemmung der Antigen-Antikörper-Reaktion
- 4.) Verminderung der Fixierung von Antikörper-Komponenten durch den Erythrocyten

Klinische und tierexperimentelle Beobachtungen geben kein einheitliches Bild (35, 86). KAPLAN glaubt eine direkte Beeinflussung des Antigen-Antikörpergeschehens auf Grund seiner Untersuchungen annehmen zu dürfen (42). Andere Autoren kommen zu ähnlichen Schlüssen (74, 87). FARESE fand eine Abhängigkeit der Cortisol-Fixation von der angebotenen Menge, wobei erst bei recht hohen Dosen der Erythrocyt und das Albumin zur Fixation herangezogen werden (28). Wie außerdem in einer anderen Untersuchung gezeigt werden konnte, wird die Aktivierung der alkalischen Phosphatase durch Auto-Antikörper

vermittels Cortison verhindert, bzw. wenn eine Aktivierung eingetreten ist kann sie durch Cortisongaben rückgängig gemacht werden (73).

Aus all diesen Mitteilungen kann der Schluß gezogen werden, daß zwar theoretische Vorstellungen und experimentelle Ergebnisse über eine mögliche der NNR-Steroide und ihrer Abkömmlinge vorhanden sind, jedoch keine ausreichenden quantitativen Ergebnisse. Auch die von uns in diesem Zusammenhang erhobenen Befunde weisen nicht eindeutig in eine bestimmte Richtung. Zwar glaubt man im direkten Coombstest eine gewisse Schutzfunktion der Steroide erkennen zu können, doch sprechen die Versuche mit radioaktiv markierter ADH dagegen; es konnte hierbei nach Vorinkubation und weiterer Variation der Untersuchungsbedingungen bei Prednisolon-zusatz keine eindeutige Verminderung der Beladungsrate festgestellt werden. Bei der Prüfung dieser Frage mit radioaktiv markiertem Endotoxin, ließ sich auch für dieses Modellantigen unter Steroideinfluß keine Minderung der Beladungsraten nachweisen. Die gemessenen Impulse lagen, wie auch bei den zuvor erwähnten Versuchen mit der Hefe-ADH, gleich mit den nicht unter Steroideinfluß inkubierten Kontrollen. Diese Frage bedarf weiterer Klärung. In diesem Zusammenhang sei auf neuere Untersuchungen von MOHRING et al. verwiesen (61).

Abschließend ergibt sich, daß die Möglichkeiten einer Beladung der roten Blutzellen mit antigenen Fremdstoffen nur in Einzelfällen überschaubar sind, während sie in den meisten Fällen recht komplexer Natur sein dürften. Die eigenen Versuche zur Überprüfung der Beladung mit Hefe-Alkoholhydrogenase (ADH) und Lipopolysacharid decken sich mit den bisher nur vereinzelt vorliegenden vergleichbaren Daten der Literatur weitgehend und lassen vermuten, daß der Erythrocyt durchaus in der Lage ist, eine ganze

Reihe von antigenen Fremdstoffen zu binden. Über die Art, bzw. den chemischen Modus einer solchen Fixation kann ebenso wie auch über die Beeinflussung dieses Vorgangs durch Nebennierenrinden-Steroide nichts Endgültiges gesagt werden.

V. Zusammenfassung

Es wurde untersucht, ob eine Beladbarkeit der erythrocytären Membran mit antigenem Material (sulfitierter ADH-S³⁵ und Cr⁵¹-Endotoxin aus *S. abortus equi*) möglich ist. Es konnte nachgewiesen werden, daß beide experimentell getesteten Substanzen fixiert werden, wobei die Bindung des Protein-Antigens eine deutliche pH-Abhängigkeit aufwies, das Endotoxin dagegen eine solche Abhängigkeit nicht erkennen ließ. Es gelang ferner eine Mehrfachbeladung durchzuführen, womit wahrscheinlich gemacht werden konnte, daß die Oberfläche der roten Blutkörperchen differente Haftareale besitzt. Außerdem konnte festgestellt werden, daß die relativ feste Anlagerung von Lipopolysaccharid, wahrscheinlich in Folge einer durch sie bedingten stärkeren Korpuskelschädigung, eine eindeutig höhere Hämolyserate der Erythrocyten im autologen Serum hervorruft. In gleicher Weise dürften die bei Antikörperbeladung (Anti-D-Serum) von O-Rh-Erythrocyten gefundenen Ergebnisse zu deuten sein. Für eine statistische Sicherung dieser Untersuchungsbefunde wäre allerdings eine größere Zahl von Einzelversuchen erforderlich. Bei den Versuchen zur Beeinflussung der Antigen- und Antikörperbindung der Erythrocyten durch gleichzeitige oder vorherige Inkubation mit Nebennierenrinden-Steroiden konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, so daß die Frage nach der Ursache der möglichen protektiven Wirkung dieser Substanzen offenbleiben müssen.

VI Literaturverzeichnis

- 1 ARRHENIUS, S.: *Ergebn.d.Physiol.*, 7, 480, 1908.
- 2 BANGHAM, A.D., B.A. PETHICA u. G.V.F. SEAMAN: *Bioch.H.* 69,
12, 1958.
- 3 BATEMAN, J.B., M.S. DAVIS u. D.A. McCAFFREY: *Am.J.of Hyg.*
62, 349, 1955.
- 4 BAUMGARTNER, W.: *Die erworbenen hämolytischen Anaemien
und der hämolytische Transfusionszwischenfall.*
B. Schwabe, Basel, 1954.
- 5 BEISENHERZ, G., H.J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK,
K.H. GARBADE, E. MEYER-ARENDT u. G.PFEIDERER:
Zschr.f.Naturf., 8b, 555, 1953.
- 6 ETHKE, K. u. W. SAVELSBERG: *Bioch.Zschr.* 320, 431, 1950.
- 7 BLUM, K.U.: *Bibl.haem.*, 12, 20, 1961.
- 8 BOCK, H.E., H.D. WALLER, G.W. LÖHR u. O.KARGES: *Klin.Wschr.*
36, 151, 1958.
- 9 BÖHME, D.: *Klin.Wschr.* 36, 18, 1958.
- 10 BOURSNEI, J.C., R.R.A. COOMBS a.V. RIZK: *J.biol.Chem.*,
55, 745, 1953.
- 11 BOYD, W.C.: *Fundamentals of Immunology. Interscience
Publ.*, New York, 1956.
- 12 BOYDEN, S.V.: *Nature* 171, 402, 1953.
- 13 BRANDE, I.A., F.J. CAREY, D. SUTHERLAND a. M. ZALEWSKY:
J. clin. Invest., 34, 850, 1955.
- 14 BRANDE, I.A., F.J. CAREY a. M. ZALEWSKY: *J. clin. Invest.*
- 15 CANTOW, H.J.: *Dechema-Monographien*, 34, 858, 1955.
27, 124, 1956.
- 16 COOK, G.M.W., D.H. HEARD a. G.V.F. SEAMAN: *Nature*, 191, 44
1961.
- 17 COOMBS, R.R.A., A.E. MOURANT a. R.R. RACE: *Brit.J.Exp.Path.*
26, 255, 1945.

- 18 COOMBS, R.R.A., A.E. MOURANT a. R.R. RACE: *Lancet*,
1, 264, 1946.
- 19 McCREA, J.: *Yale J.biol.Med.*, 26, 191, 1953.
- 20 DACIE, J.V.: *The hemolytic anemias. Congenital and acquired.* Churchill, London, 1954.
- 21 DANDLICHER, W.B., M. MOSKOWITZ, B. ZIMMERMANN a. M. CALVIN:
J.am.chem.Soc., 72, 5587, 1950.
- 22 DANON, D., A.deVRIES, M. DJALDETTI a. C. KIRSCHMANN:
Brit.J.of Hem., 8, 103, 1963.
- 23 DAUSSET, J.: *Arch.int.Med.*, 85, 416, 1950.
- 24 DONATH, J.u.K. LANDSTEINER: *Münch.Med.Wschr.* 51, 1590, 1904.
- 25 DUESBERG, R.: *Schweiz.Med.Wschr.*, 90, 1208, 1960.
- 26 DUESBERG, R.: 7. Kongr.Int.Häm.Ges., Rom, 1958
- 27 EJBY-POULSEN, P.: *Nature*, 174, 929, 1954.
- 28 FARESE, R.V. u. J.E. PLAGER: *J.clin.Invest.* 41, 53, 1962.
- 29 FREDMAN, A.C., P.S. BARR a. E.A. BRODIE: *AmJ.Med.*, 20, 806;
1956.
- 30 GARDINER, E., C. St. WRIGHT a. B.Z. WILLIAMS: *J.Lab.clin.*
Med., 58, 743, 1961.
- 31 GRAMLICH, F. u. D. MOHRING: *Klin.Wschr.* 39, 1072, 1961.
- 32 GRAMLICH, F., J. FISCHER u. D. MOHRING: *Klin.Wschr.*
40, 955, 1962.
- 33 HARRIS, J.W.: *J.Lab.clin.Med.*, 47, 760, 1956.
- 34 HEGEMANN, F.: *Zschr.Imm.Fsch.*, 114, 1, 1957.
- 35 HILBER, H. u. B. MENTZ: *Klin.Wschr.*, 8, 136, 1952.
- 36 HOTCHIN, J.E., S.E. COHEN, K. ROSGA a. C. ROSGA: *Virology*,
6, 689, 1958.
- 37 HOWE, C.: *J.Imm.*, 66, 9, 1951.
- 38 HSIEN, W.: *J.Bioch.*, 2, 189, 1923.

- 39 JAMES, J.G., O.J. PURNELL a. E.I. EVANS: J.clin.Invest.
30, 181, 1951.
- 40 KABAT, E.A.: Blood group substances Academic Press,
New York, 1956.
- 41 KABAT, E.A. a. M.M. MAYER: Experimental Immunochemistry,
Ch.C. Thomas, Publ., Springfield, 111, 1958.
- 42 KAPLAN, M.E. a. J.H. JANDL: J.exp.Med. 114, 921, 1961.
- 43 KLENK, E. u. H. LEMPFRIED: Zschr.f.phys.Chem., 307, 278, 1957.
- 44 LARIZZA, P.: Fol.Haem., N.F., 6, 1, 1961.
- 45 LANDSTEINER, K.: The specificity of the serological
reactions. Harvard University Press,
Cambridge, 1945.
- 46 LASCH, F., W. MANTHE u. G. SCHNEIDER: Wien.klin.Wschr.
73, 289, 1961.
- 47 LEY, A.P., A.G. CAHAN a. K. MAYER: Proc. 7th Congr.Int.Soc.
Blood Transfusion, Rome 1958. Karger, Basel.
- 48 LÖHR, G.W. u. H.D. WALLER: DMW, 86, 2, 1961.
- 49 LOGHEM, J.J. van, M. van der HART u. M.E. LAND: Vox sang.
(A.F.), 5, 125, 1955.
- 50 LÜDERITZ, O., O. WESTPHAL, E. EICHENBERGER u. E. NETER:
Bioch.Z., 330, 21, 1958.
- 51 LÜDERITZ, O., O. WESTPHAL, K. SIEVERS, E. KRÖGER, E. NETER
u. O.H. BRAUN: Bioch.Z., 330, 34, 1958.
- 52 MASOUREDIS, S.P.: Science, 131, 1442, 1960.
- 53 MOESCHLIN, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen.
Thieme, Stuttgart, 1958.
- 54 MONGAR, J.L.: Enzymes and drug action. Ciba foundation
symposion, Churchill, London, 1962.
- 55 MOHRING, D.: Ärztl.Wschr., 13, 366, 1958.
- 56 MOHRING, D., F. GRAMLICH u. E. WIETHOFF: Naturwiss.,
47, 160, 1960.
- 57 MOHRING, D. u. F. GRAMLICH: Klin.Wschr., 39, 139, 1961.

- 58 MOHRING, D. u. F. GRAMLICH: Ärztl.Frschg., 15, I/206, 1961.
- 59 MOHRING, D. u. F. GRAMLICH: Vortrag 8.Int.Kongr.f.Häm.,
Wien, 1961.
- 60 MOHRING, D.: 69.Kongr.d.Häm.Ges., Wiesbaden, 1963.
- 61 MOHRING, D.: pers.Mitteilung.
- 62 MUIRHEAD, E.E., E.R. HALDEN a. M. GROVES: Arch.int.Med.
101, 87, 1958.
- 63 PERLMAN, G.E. a. L.G. LONGSWORTH: J.am.chem.Soc., 70,
2719, 1948.
- 64 PIPER, W. u. G. RUHENSTROTH-BAUER: Klin.Wschr., 34, 11, 1956.
- 65 PIROFSKY, B., M.S. CORDOVA u. Th.L. IMEL: Vox sang.,
7, 3, 1962.
- 66 PLENZIG, H.: DMW, 87, 884, 1962.
- 67 PONDER, E.: Hemolysis and related phenomena.Grune and
Stratton, New York, 1948.
- 68 PONDER, E. a. R.V. PONDER: J.gen.Phys., 43, 503, 1960.
- 69 PRANKERT, T.A.J.: The red cell.Blackwell Scientific
Publications, Oxford, 1961.
- 70 RICKETTS, W.E.: Blood, 3, 1025, 1948.
- 71 RIGBY, P.G., A. BETTS, G.H. FRIEDELLE a. Ch.P. EMERSON:
J.Lab.clin.Med., 59, 638, 1962.
- 72 RUTENBERG, S.H., F.B. SCHWEINBURG a. J. FINE: J.exp.Med.
112, 801, 1960.
- 73 SALVIDIO, E. u. V. ROSSI: Acta haem., 22, 286, 1959.
- 74 SALVIDIO, E. u. V. ROSSI: Wien Zschr.inn.Med., 42, 311, 1961.
- 75 SELWYN, J.G. a. J.V. DACIE: Blood, 11, 414, 1954.
- 76 SCHUBOTHE, H. u. F. GROSS: Schweiz.med.Wschr., 83, 1048, 1953.
- 77 SCHUBOTHE, H. u. L. HEILMEYER: Serologie und Bedeutung
der Auto-Hämantikörper. Karger, Basel, 1958.

- 78 SCHUBOTHE, H.: Ergebnisse inn.Medu.Kinderheilkunde, (N.F.), 11, 466, 1959.
- 79 SCHULTZE, H.E.: Immunitätslehre in Klinik der Gegenwart Bd. XII.Urban u.Schwarzenberg, Berlin-München, 1960.
- 80 SØRENSEN, S.P.L.: Bioch.Zschr., 21, 131, 1909.
- 81 SØRENSEN, S.P.L.: Ergebn.Physiol., 12, 393, 1912.
- 82 STAVRITZKY, A.B. u. E.R. ARQUILLA: Int.Arch.Allergy, 13, 1, 1958.
- 83 STICKL, H.: DMW, 87, 207, 1962.
- 84 STORTI, E.F.VACCARI u. E.BALDINI: Experientia, XII, 108, 1956.
- 85 THORN, G.W., P.H.HORSHAM, T.H.FRAWLEY, M.ROCHE, D.STAEHELIN a.D.L.WILSON: New.Engl.J.of Med., 242, 783, 1950.
- 86 TISCHENDORF, W., G.ECKLEBE u.E.THOFERN: Zschr.exp. Med., 118, 203, 1952.
- 87 WAGNER, K. u. G.STEPANSCHITZ: Münch.Med.Wschr., 44, 1286, 1954.
- 88 WEINSTEIN, I.M. u. E.BEUTLER: Mechanismus of Anemia. McGraw-Hill, New York, 1962.
- 89 WESTPHAL, O.: Naturw., 46, 50, 1959.
- 90 WINTHROBE, M.M.: Clinical Hematology. Lea and Febiger, Philadelphia, 1952. Zit. nach Wiss.Tabellen, Geigy.

Nachtrag

- 52 a MIESCHER, P. u. K.O. VORLAENDER: Immunpathologie in Klinik und Forschung. Thieme, Stuttgart, 1961.

Lebenslauf

Geboren wurde ich am 6. 3. 1938 in Mainz als Sohn des Studienassessors Heinrich Stork und seiner Ehefrau Margarete geborene Prause. Bedingt durch die Kriegseignisse besuchte ich nacheinander die Grundschulen in Mainz, Vockenrod (Oberhessen) und Ingelheim (Rhein). Im Jahre 1947 trat ich in das neusprachliche Sebastian-Münster-Gymnasium in Ingelheim (Rhein) ein. Nach der Untertertia war ich Schüler des altsprachlichen Rabanus-Maurus-Gymnasiums Mainz.

An dieser Schule legte ich im Jahre 1956 die Reifeprüfung ab. Ich begann mein Studium an der Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz mit den Fächern Jurisprudenz und Volkswirtschaft im Sommersemester 1956. Im Wintersemester 1956/57 wechselte ich zur Medizinischen Fakultät.

Nach dem Wintersemester 1958/59 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Meine klinischen Studien, die ich ebenfalls an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz absolvierte, beendete ich dann nach dem Sommersemester 1962 mit dem Staatsexamen.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Duesberg für die Güte danken, daß ich in seiner Klinik arbeiten durfte.

Herrn Priv.Do. Dr. D. Mohring danke ich für die Überlassung des Themas und die tatkräftige Unterstützung, die er mir stets gewährte.

